

Sykファミリーチロシンキナーゼ阻害作用を持つ 1,2,4-triazolopyrimidineおよび imidazopyrimidine誘導体の創製研究

著者	平林 明仁
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬第527号
URL	http://hdl.handle.net/10097/51106

氏 名 (本 籍) ひら ばやし あき ひと
平 林 明 仁

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬 第 527 号

学位授与年月日 平成 21 年 9 月 4 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

學位論文題目

Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害作用を持つ 1,2,4-triazolopyrimidine および imidazopyrimidine 誘導体の創製研究

論文審查委員	(主查)	教授	土井隆行
		教授	岩淵好治
		教授	根東義則

論文内容要旨

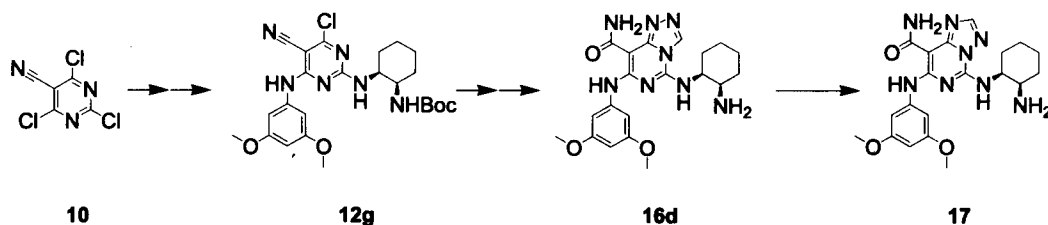
【はじめに】

免疫反応は体外から侵入した異物や微生物などから身を守るために、生物が獲得してきた巧妙な自己防衛機構である。この炎症、免疫反応にはサイトカインが深く関与しており、細胞膜上の受容体と結合して細胞内シグナル伝達機構機構を活性化する。細胞シグナル伝達機構には様々なプロテインチロシンキナーゼ (PTKs) が存在し、細胞の分化、増殖、アポトーシス等の調整を行っている。このうち、Syk ファミリーチロシンキナーゼは Spleen tyrosine kinase (Syk), zeta-associated protein kinase of 70 kDa (ZAP-70) という相同性の高い2種類のチロシンキナーゼで構成され、前者はB細胞の活性化、好酸球の生存、血小板の活性化に、後者はインターロイキン2 (IL-2) の産生やT細胞の活性化に深く関与していることが知られている。近年、自己免疫疾患の新たな治療ターゲットとして Syk が注目され、臨床試験が行われている化合物もある。筆者は、Syk ファミリーチロシンキナーゼに対する阻害剤がアレルギー・自己免疫疾患でのアンメット・メディカル・ニーズを充足する新たな治療剤となりうると考え、Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤開発を目指して研究に着手した。

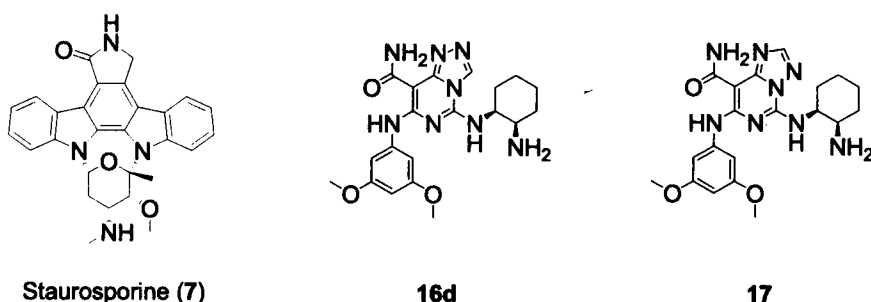
【要約】

1. 1,2,4-Triazolopyrimidine 誘導体のデザイン, 合成および生理活性

Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤開発にあたり、研究当初 Syk ファミリーチロシンキナーゼに関する X 線結晶構造解析の情報が高かったため、筆者は structure-based drug design (SBDD) 手法と文献情報を取り入れて、新規 Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤としての 1,2,4-triazolopyrimidine 誘導体をデザインし、その合成を行った (Scheme 1)。2,4,6-Trichloropyrimidine-5-carbonitrile (10) を出発原料



Scheme 1. 1,2,4-Triazolopyrimidine 誘導体の合成ルート



として、4位および2位にアミンを順に導入した後、1,2,4-triazolopyrimidine 骨格を構築し、化合物 **16d** を、さらに骨格転位を経て **17** の合成を達成した。得られた各種 1,2,4-triazolopyrimidine 誘導体について *in vitro* での生理活性評価を行い、**16d** および **17** について Syk ファミリーチロシンキナーゼに対する強い阻害活性を見出した (Table 1)。筆者は、SBDD を取り入れた手法が新規 Syk ファミリーチロシンキナーゼの創製に大きく貢献したと考えている。

Table 1. Triazolopyrimidine 誘導体の Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害活性

No	IC ₅₀ (μM) ^{a)}					
	Syk	ZAP-70	Lck	PKCβII	PBMC ^{b)}	WB ^{c)}
Staurosporine (7)	0.003	0.053	0.018	0.004	0.016	0.10
16d	0.009	0.12	0.18	0.68	0.046	0.44
17	0.004	0.33	0.59	2.66	0.076	0.48

^a The IC₅₀ values were determined in duplicate. ^b peripheral blood mononuclear cell.

^c whole blood.

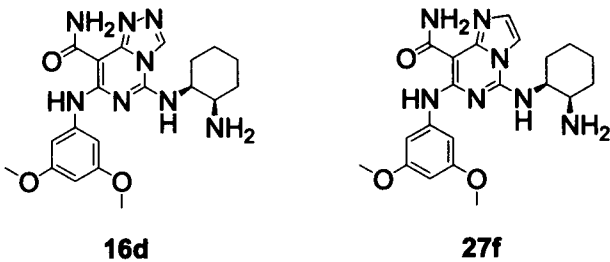
2. Imidazopyrimidine 誘導体のデザイン、合成および生理活性

次に *in vitro* で高活性を示した化合物 1,2,4-triazolo[4,3-*c*]pyrimidine 誘導体 **16d** について *in vivo* での生理活性評価を行ったところ、期待する薬効を示さなかった。その原因を究明し、**16d** は水に対する溶解度が低く、更に細胞膜透過性も良くないことを明らかにした。そこで筆者は、この問題を解決するため新規 Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤として imidazo[1,2-*c*]pyrimidine 誘導体をデザインし、その誘導体合成を行った。得られた新規 imidazo[1,2-*c*]pyrimidine 誘導体 **27f** は、上述の triazolo[4,3-*c*]pyrimidine 誘導体 **16d** と比較すると、水への溶解度が約3倍向上し、極性表面積 (PSA) の低減に伴うと考えられる Caco 2 膜透過性も大幅に向上した (Table 2)。実際に、経口投与において血中への投与量依存的な濃度上昇が達成され、期待した通り **27f** は *in vivo* でも有効であるという結果を得ている。すなわち、**27f** は Syk が関与するマウスの受動的アナフィラキシー (PCA) 反応モデルおよび ZAP-70 が関与するマウス concanavalin A 誘発 IL-2 産生モデルで、投与量依存的な改善傾向を示した。この結果から筆者は、Syk および ZAP-70 が関与するアレルギー疾患や自己免疫疾患に対して、Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤が有効な治療剤になり得ると考えている。

3. 高い酵素選択性を示す ZAP-70 阻害剤の創製

Syk についてはノックアウトマウスの実験から、出血による胎生致死が報告され、更に Syk のミューテーションは前 B 細胞抗原受容体からのシグナルを妨害することによって B 細胞の分化を減少させるなどの危惧が指摘されており、医薬品の標的分子として懸念が残る。これに対して、ZAP-70 欠損患者は、T 細胞受容体を介する T 細胞の増殖反応が認められないこと、ZAP-70 欠損患者では、既存の免疫抑制剤で報告されている腎毒性や消化管障害等は現れないため、高い酵素選択性を持つ ZAP-70 阻害剤は腎毒性

Table 2. 16d と 17 の物理化学的特性と酵素阻害活性

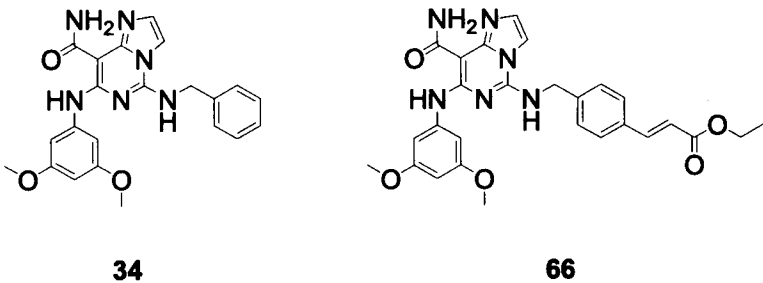


No	Solubility in water (μg/mL)	PSA (Å ²)	Caco 2/Papp (10 ⁻⁶ cm/s)	IC ₅₀ (μM) ^{a)}			
				Syk	ZAP-70	PBMC	WB
16d	351	141	0.01	0.009	0.12	0.046	0.44
27f	930	128	3.33	0.006	0.23	0.058	0.28

^a The IC₅₀ values were determined in duplicate.

などの副作用の無い新規の免疫抑制剤となりうると期待される。ところが、酵素選択性の高い ZAP-70 についての論文報告はほとんどない。筆者は前述した imidazo[1,2-*c*]pyrimidine 誘導体探索の過程で、**34** が Syk をはじめとするチロシンキナーゼに対する阻害活性が弱く、ZAP-70 を選択的に阻害することを見出した。そこで、**34** の構造を基に 5-benzylaminoimidazo[1,2-*c*]pyrimidine 誘導体を各種合成し、その酵素選択的阻害活性の評価を行った。その結果、構造的に新規であり、かつ論文報告がほとんどない高い酵素選択性を示す **66** の創製に成功した (Table 3)。**66** は ZAP-70 に対し IC₅₀ 値が 0.088 μM と高い阻害活性を示し、Syk や Lck などをはじめとする種々のチロシンキナーゼ、セリンスレオニンキナーゼに対しては 10 μM 以下ではほとんど阻害活性を示さない。殊に同じファミリーに属し、相同性の高い

Table 3. ZAP-70 選択的 imidazo[1,2-*c*]pyrimidine 誘導体の酵素阻害特性



No	IC ₅₀ (μM) ^{a)}								
	ZAP-70	Syk	Lck	PKCβII	EGFR	Src	ERK-1	JNK-1	p38α
34	0.40	4.3	>25	NT ^b	NT ^b	NT ^b	NT ^b	NT ^b	NT ^b
66	0.088	>12.5	>12.5	>10	>10	>10	>10	>10	>10

^a The IC₅₀ values were determined in duplicate. ^b NT, not tested.

Syk に対してこのような高い酵素選択的阻害活性を示す化合物は、これまで報告例がなく、新規 ZAP-70 選択的阻害剤の創製において重要な知見を得ることができた。今後、細胞評価系、*in vivo* での薬効薬理試験に進めることにより、移植医療に貢献できる新規の免疫抑制剤開発への基盤研究となると考えている。

審査結果の要旨

本論文は、spleen tyrosine kinase（以下 Syk と略す）および zeta-associated protein kinase of 70kDa（以下 ZAP-70 と略す）に対する新規阻害剤の開発研究における成果について述べられている。

序論では、上述の Syk ファミリーチロシンキナーゼが細胞の分化、増殖および免疫反応の調節に深く関与していることについて概説し、Syk 阻害剤がアレルギー疾患および自己免疫疾患治療薬として、また ZAP-70 阻害剤が免疫抑制剤として重要と考えるに至った経緯について述べ、新規 Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤を創製するという本研究の意義と目的を明らかにしている。

第一章「新規 Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤の探索」では、structure-based drug design (SDBB) を基軸に、新規 1,2,4-triazolo[4,3-*c*]pyrimidine 誘導体および 1,2,4-triazolo- [1,5-*c*]pyrimidine 誘導体を分子設計し、三十種類程度の誘導体合成を行ったことについて述べている。*In vitro* における生理活性試験により構造活性相関を明らかにするとともに、二つの高活性化合物を見出している。しかし、*in vivo* では期待する薬効を示さないことからその原因を精査し、これらの化合物は水への溶解性および細胞膜透過性が十分でないことが問題であることを明らかにしている。

第二章「経口吸収性を示す新規 Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤 imidazo[1,2-*c*]pyrimidine 誘導体の創製」では、前章の結果をうけ、極性表面積が低減されると期待した imidazo[1,2-*c*]pyrimidine 誘導体を分子設計し、その合成を達成したことについて述べている。*In vitro* 試験で Syk および ZAP-70 に対して強い阻害活性をもつ化合物を見出すことに成功している。さらに *in vivo* 試験で、Syk 阻害効果についてはマウスの受動的アナフィラキシー反応モデル、そして ZAP-70 阻害効果についてはマウス concanavalin A 誘発 IL-2 産生モデルにおいて、いずれも経口投与量依存的に改善傾向を示すことを明らかにしている。本結果は Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤が、Syk および ZAP-70 が関与する炎症・免疫反応の抑制に有効であることを示しており、経口吸収性に優れた Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤の創製に成功している。

第三章「高い酵素選択性を示す ZAP-70 阻害剤の創製」では、前章で述べている化合物展開をもとに、ZAP-70 選択的阻害剤の開発研究を行った結果について述べている。Imidazo[1,2-*c*]pyrimidine 化合物についてさらなる誘導体合成を行い、Syk に対するより ZAP-70 に対して 100 倍以上の阻害活性をもつという前例のない化合物を見出している。

結論では、本論文を総括している。

以上、要するに本論文は 1,2,4-triazolopyrimidine および imidazopyrimidine 誘導体が Syk ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤として有効であることを見出した研究成果であり、薬学上貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。